

Streszczenie

Metformina, lek pierwszego rzutu w leczeniu cukrzycy typu II, wykazuje działanie przeciwnowotworowe. Jednak, molekularny mechanizm działania przeciw-nowotworowego metforminy nie jest znany. Wysłunięto hipotezę udziału metforminy w indukcji PRODH/POX-zależnej apoptozy/autofagii w komórkach nowotworowych. PRODH/POX jest mitochondrialnym enzymem degradującym prolinę. Proces ten generuje ATP służące przeżyciu lub reaktywne formy tlenu (RFT) indukujące apoptozę lub autofagię. Podłożem tej hipotezy jest pobudzające działanie metforminy na AMPK oraz za pośrednictwem tej kinazy na ekspresję PRODH/POX. Celem przeprowadzonych badań była ocena porównawcza wpływu metforminy na procesy PRODH/POX zależnej apoptozy i autofagii w komórkach czerniaka (melanomy, C32) wykazujących wysoką ekspresję PRODH/POX i fibroblastach skóry ludzkiej (CRL) pozbawionych aktywności tego enzymu. Biorąc pod uwagę ważną rolę dostępności proliny w indukcji PRODH/POX-zależnych funkcji przeprowadzono ocenę biosyntezy kolagenu, głównego procesu utylizacji wewnątrzkomórkowej wolnej proliny w badanych modelach komórkowych. Przeżywalność komórek, integralność błon komórkowych oraz aktywność prolidazy oceniono metodą kolorymetryczną. Fazy cyklu komórkowego określono przy użyciu cytometru przepływowego. Biosyntezę DNA i biosyntezę kolagenu oznaczono metodą radiometryczną. Powstawanie RFT oceniono metodą fluorescencyjną. Ekspresję białek oceniono za pomocą techniki Western blot i immunocytochemii. Stężenie wewnątrzkomórkowej proliny oznaczono metodą chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas.

Metformina obniżyła przeżywalność komórek i integralność błon komórkowych C32 jak i fibroblastów CRL, jednak proces ten był bardziej nasilony w komórkach C32. Zjawisku temu towarzyszyło obniżenie biosyntezy DNA. W komórkach C32 metformina przyczyniła się do wzrostu ilości komórek znajdujących się w fazie sub-G1 (charakterystycznej dla komórek apoptotycznych) przy jednoczesnym obniżeniu ilości komórek znajdujących się w fazie G1 (charakterystycznej dla komórek prawidłowych). Natomiast w komórkach CRL zaobserwowano odwrotne zjawisko, obniżenie ilości komórek w fazie sub-G1 oraz zwiększenie ilości komórek w fazie G1. W komórkach C32 Metformina nasilała ekspresję białek pro-apoptotycznych (aktywnej formy kaspazy-9, kaspazy-3 i PARP) oraz autofagowych (Beklina-1, Atg7). Nie zaobserwowano tego zjawiska w komórkach CRL.

Przedstawiono dowody, że pro-apoptotyczne działanie metforminy zachodzi przy udziale AMPK i PRODH/POX. Metformina nasilała ekspresję AMPK w obydwu liniach komórkowych, natomiast PRODH/POX jedynie w komórkach C32, bowiem fibroblasty zawierają śladową ilość tego enzymu. Metformina poprzez hamowanie biosyntezy kolagenu (procesu zużytkowującego Pro) w komórkach C32 zapewniała substrat (Pro) dla PRODH/POX-zależnej apoptozy. Wykazano, że stymulujące działanie metforminy na PRODH/POX-zależną apoptozę w komórkach C32 zachodziło poprzez generowanie ROS. Podsumowując, niniejsze badania sugerują, że metformina może stymulować apoptozę w komórkach czerniaka poprzez kaskadę procesów obejmujących indukcję AMPK, PRODH/POX, wzrost ilości proliny i generację RFT. Wyniki tych badań mogą przyczynić się do udoskonalenia farmakoterapii raka skóry.